张芷柔,单 馨,陈海洋,等.水量差异对再生水灌溉土壤耐药性传播的影响 [J]. 中国环境科学, 2025,45(10):5639-5647.
Zhang Z R, Shan X, Chen H Y, et al. The impact of differences in irrigation water volume on the dissemination of antibiotic resistome in soil irrigated with reclaimed water [J]. China Environmental Science, 2025,45(10):5639-5647.

水量差异对再生水灌溉土壤耐药性传播的影响

张芷柔[1],单 馨[1],陈海洋[1*],刘 畅[2**] (1.北京师范大学水科学研究院,北京 100875；2.生态环境部南京环境科学研究所,江苏 南京 210042)

摘要：再生水是农业领域重要的灌溉水源,但再生水中含有抗生素抗性基因(ARGs),是潜在的污染源.再生水灌溉量对土壤耐药性水平的影响的相关研究报道较少.本文构建对照试验,结合宏基因组分析手段,对以上问题进行了对比分析.结果显示,在再生水-土壤灌溉系统中共鉴定出分属于 27 种类型的 442 种 ARGs.再生水灌溉土壤中 ARGs 丰度增长了 4.04%~28.62%,黏菌素类、β-内酰胺类、多药类等 ARGs 的丰度增幅最大.灌溉过程中,土壤 ARGs 丰度、多样性和风险性以及再生水贡献度均呈现出整体先上升后下降的波动变化过程,高灌溉量会强化土壤耐药性水平,这在灌溉中期尤为明显.但受土壤基质效应和恢复能力影响,灌溉量差异对灌溉土壤耐药性的影响并不显著(方差分析,$P>0.1$).网络分析和方差分解分析(VPA)结果显示,微生物群落是再生水灌溉土壤 ARGs 传播的主要影响因素,而高灌溉量提高了以整合子 *intI1* 为代表的移动遗传元件(MGEs)对 ARGs 传播的贡献度,这导致源特征显著弱化.研究结果可为再生水和土壤抗生素耐药性传播提供基础理论补充,为土壤抗生素耐药性风险防控和再生水利用提供科学指导.

关键词：抗生素抗性基因；再生水；灌溉水量；土壤；来源分析
中图分类号：X53 **文献标识码**：A **文章编号**：1000-6923(2025)10-5639-09

The impact of differences in irrigation water volume on the dissemination of antibiotic resistome in soil irrigated with reclaimed water. ZHANG Zhi-rou[1], SHAN Xin[1], CHEN Hai-yang[1*], LIU Chang[2**] (1.College of Water Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China; 2. Nanjing Institute of Environmental Science, Ministry of Ecology and Environment of the People's Republic of China, Nanjing 210042, China). *China Environmental Science*, 2025,45(10)：5639~5647

Abstract: Reclaimed water is an important irrigation source in the agricultural field, but it contains antibiotic resistance genes (ARGs), which are potential pollutants. There have been relatively few reports on the influence of reclaimed water irrigation volume on the level of soil antibiotic resistance. This study constructed a controlled experiment and conducted a comparative analysis of the above issues using metagenomic analysis. The results showed that a total of 442 ARGs belonging to 27 ARG types were identified in the reclaimed water-soil irrigation system. The abundance of ARGs in in reclaimed water irrigation soil increased by 4.04% -28.62%, with the greatest increases in the abundance of colistin, β-lactam, and multidrug resistance genes. During the irrigation process, the abundance, diversity, and risk of soil ARGs, as well as the contribution of reclaimed water, exhibit anoverall fluctuating trend of first increasing and then decreasing. High irrigation volume enhanced the level of soil antibiotic resistance, which was especially evident in the middle stage of irrigation. However, due to soil matrix and recovery capacity, the difference in irrigation volume did not significantly affect the antibiotic resistance of irrigated soil throughout the entire process (variance analysis, $P>0.1$). Network analysis and variance partitioning analysis (VPA) indicatedthat microbial communities are the main factor affecting the transmission of ARGs in reclaimed water-irrigated soil, while high irrigation volume increased the contribution of mobile genetic elements (MGEs) represented by the integrator *intI1,* to the transmission of ARGs, resulting in a significant weakening of source characteristics. The research results provide fundamental theoretical support for understanding the spread of antibiotic resistance in reclaimed water and soil, and offer scientific guidance for the risk prevention and control of soil antibiotic resistance and the utilization of reclaimed water.

Key words: antibiotic resistance genes; reclaimed water; irrigation water volume; soil; source analysis

抗生素是迄今为止治疗人类疾病最有效的药物之一,也被广泛应用于农业生产、畜禽养殖和动物疾病的防治中[1].然而,大部分抗生素无法被动物和人体吸收,随粪便排到环境中[2],残留的抗生素对环境中的微生物施加选择压力,导致微生物产生抗生素抗性基因(ARGs)[3].在人类活动的影响下,ARGs

收稿日期：2025-03-23
基金项目：北京自然科学基金资助项目(8222059)
* 责任作者，副教授，chen.haiyang@bnu.edu.cn; ** 助理研究员，liuchangslgc@163.com

可通过移动遗传元件(MGEs)在微生物群落中发生水平转移(HGT),进而在环境中传播,对公众健康构成严重威胁[4-5].当 ARGs 转移到人类致病菌中,可能会导致“无药可医”的危险情况[6].

如今,水资源短缺问题日益严重[7],再生水作为一种水量稳定、质量可靠、成本低廉的水资源,已在农业领域广泛应用[8].但是,现有的污水处理工艺主要聚焦于去除有机物、氮、磷等常规污染物,对于 ARGs 和抗生素抗性细菌(ARB)等新污染物的去除效果有限,更有甚者,在处理后,部分 ARB 和 ARGs 的丰度出现了升高的趋势[9].再生水灌溉会将这些新污染物引入到土壤中,导致土壤中耐药性水平的提高[1].有研究表明再生水是灌溉农田重要的抗生素耐药性的重要来源[10-12].

在农业活动中,灌溉水量作为灌溉的关键参数,其选择受到植被的水分需求、土壤特性、气候条件等多重因素的影响.例如,植被在生长期和开花期通常需要更多的水分来支持其细胞生长和代谢活动,而在休眠期或干旱适应期对水分的需求则较低[13].因此,需要根据植被对水分的需求、土壤的保水能力和排水性对灌溉量进行选择,以满足不同土壤条件下各类植被正常生长所需的水分供应. 灌溉量的差异会改变再生水耐药组与土壤耐药组的交互比例, 这可能会影响土壤耐药性特征的变化过程.但受土壤吸附和截留能力的限制,过多的灌溉水量可能不会导致更多的再生水源微生物和耐药组在土壤中成功定殖[14].灌溉水量差异对再生水灌溉土壤的抗生素耐药性水平的影响并非简单的线性叠加,其影响需进一步研究.

本研究构建了两组对照实验,旨在揭示再生水灌溉量差异对灌溉土壤抗生素耐药性的影响.研究基于高通量测序的宏基因组分析,表征了再生水灌溉土壤耐药组组成概况,比较了不同灌溉量条件下土壤耐药组变化过程和风险特征, 定量分析了再生水对灌溉土壤抗生素耐药性的贡献,结合微生物群落和 MGEs 特征揭示了灌溉土壤耐药组传播机制差异.研究可为再生水和土壤抗生素耐药性传播提供基础理论补充,为土壤抗生素耐药性风险防控和再生水利用提供科学指导.

1 材料与方法

1.1 样品采集

再生水采集自北京市海淀区某再生水厂排口处,该排口出水流量稳定,水体清澈且无异味.该再生水厂主要处理生活污水,日处理能力 55 万 m^3,主要的处理工艺为厌氧-缺氧-好氧工艺和膜生物反应器.再生水每 8d 采集一次,用于当日灌溉.使用洗净的不透明聚乙烯桶采集刚排放的再生水,采集的再生水 4℃条件下保存,在 1h 内送至实验室,用于后续灌溉和测试工作.灌溉期间,再生水的 pH 值为(7.52±0.31),总有机碳(TOC)为(5.80±1.66) mg/L,总氮(TN)为(11.82±2.72) mg/L,总磷(TP)为(0.37±0.19) mg/L 化学需氧量(COD)为(13.70±5.53) mg/L.

实验所用土壤为北京市昌平区某荒地的表层土壤,采集深度为 0.25~0.50m,该荒地土壤受人为干扰影响较小.采集的土壤装至聚乙烯袋中,土壤样本在 25℃条件下干燥一夜,粉碎、过筛去除植物根系和大于 2mm 的颗粒等物质.处理好的土壤用于实验装填和相应测试.未受灌溉土壤 pH 值为(8.37±0.07),TOC 为(18.24±0.60) g/kg,TN 的范围为(3.10±0.04) mg/g,TP 为(0.85±0.01)mg/g.

1.2 实验设计

实验在塑料花盆(口径 22cm,底径 20cm,高 20cm)中进行,将土壤混匀后在花盆中均匀填充 15cm 高并压实,填充土壤重量 895g.实验共有 2 组,参照实际植被种植设计灌溉频率和灌溉量,设计再生水灌溉频率为每 8d 一次,低灌溉量(LI)实验组单次灌溉量为 150mL,高灌溉量(HI)实验组单次灌溉量为 300mL.实验使用漫灌形式进行灌溉,在第 0d、第 8d 和第 16d 采集样品,之后每 16d 采集一次样品,进行相应指标测试.

1.3 宏基因组分析

1.3.1 DNA 提取和高通量测序 再生水在取样后 12h 内依次使用 0.45 和 0.22μm 混合纤维素滤膜过滤,将过滤后的滤膜一起保存在无菌塑料容器中.滤膜和土壤样品在进行 DNA 分析测试前一直在-80℃条件下进行保持.使用 TIANamp Soil DNA Kit 试剂盒(北京天根)提取土壤和再生水滤膜样品中的总 DNA,使用凝胶电泳(1%琼脂糖)来检查 DNA 的质量,并用 Qubit 2.0Fluroeter dsDNA 检测试剂盒(美国 Life Technologies)检测 DNA 的浓度.对于 DNA 质量和浓度满足测序要求的样品,使用 NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit for Illumina 试剂盒(美国

Nutrient Enhancing Balancer)将高质量的 DNA 用于文库构建(350bp).在诺禾致源科技股份有限公司(天津)的 Illumina HiSeq 4000 平台使用鸟枪法(shotgun)进行测序,采用 150bp 的成对末端策略.

1.3.2　宏基因组组装和开放阅读框预测　使用 FASTP(v0.19.5)过滤原始的测序序列,以去除质量值低于 20 的低质量序列.使用 MEGAHIT(v1.1.2)对高质量序列进行组装,参数设置为默认参数,组装后超过 500bp 的重叠群用于下游分析.使用 MetaProdigal (v2.6.3)(参数选择为“-p meta”)分级重叠群基于序列同一性来预测开放阅读框(Open reading frames, ORFs).

1.3.3　ARGs、MGEs 和微生物分类学注释　本研究中选择 HMD-ARG 数据库[15]和 MGE 数据库[16]作为参考数据库对 ARGs 和 MGEs 进行注释.通过检查数据库的结构化注释,使用自定义脚本统一基因名称.使用 DIAMOND(v2.0.9)预测的 ORFs 与参考数据库进行比较,筛选出同源性超过 60%、查询覆盖率超过 70%的序列.根据对应数据库的结构化注释对类 ARG 的 ORFs 进行分类.注释的 ORFs 被规范化为单元宏基因组数据集,通过添加相同类型的覆盖率值来计算每个 ARGs 的覆盖率.对于微生物组 taxa 分类注释,使用默认参数的 Kaiju 分类器在 proGenomes 数据库中搜索 ORFs 的蛋白序列[17].MEGs 的注释方式与 ARGs 一致.将识别的类 ARG 和类 MGE 的 ORFs 进行归一化处理,单位为每 Giga base (×/Gb)[18].

1.4　分析方法

1.4.1　ARGs 的风险识别　利用基于组学的方法评估耐药组健康风险[19].该方法主要涉及人类可及性(HA)、可移动性(MO)、致病性(PA)和临床相关性(CA)等四个指标,公式如下:

$$\mathrm{TRI}=\sum_{i=1}^{n}\mathrm{Abun}_i\cdot\mathrm{RI}_i \quad (1)$$

$$\mathrm{RI}_i=\mathrm{HA}_i\cdot\mathrm{MO}_i\cdot\mathrm{PA}_i\cdot\mathrm{CA}_i \quad (2)$$

式中:TRI(Total risk index)代表样本的总风险指数;RI_i(Risk index)是第 i 个 ARG 的风险指数;n 是样品中检测到的 ARG 数量;$Abun_i$ 表示样品中第 i 种 ARG 的丰度;HA_i 表示第 i 种 ARG 从环境向人类致病菌的转移能力;MO_i 表示第 i 个 ARG 通过水平基因转移在宿主之间的转移能力;PA_i 表示第 i 个 ARG 从非致病性 ARG 宿主向致病性 ARG 宿主的转移能力;CA_i 表示第 i 个 ARG 的临床可用性.

1.4.2　ARGs 的来源追溯　快速期望最大化微生物源追踪(FEAST)方法是 Shenhav 等[20]提出的一种新型微生物源追踪(MST)方法,是一种基于机器学习分类的广泛应用的 MST 工具[21],它也是一种基于群落的 MST 方法,它假设每个汇是已知和未知源的凸组合,并使用多项式分布来模拟源-汇数据. FEAST 使用期望最大化算法来估计源贡献的比例,基准实验表明,FEAST 在估计准确性方面具有一些明显的优势,特别是如果汇群落包含来自未表征来源的物种/基因.本研究利用 FEAST 追踪再生水灌溉后土壤中的 ARGs 来源.再生水灌溉后土壤中的 ARGs 被假定为“汇”,再生水和原始土壤被假定为 ARGs 的“源”.为了减少预测的误差,在研究中进行了 5 次独立运行.

1.4.3　统计分析　采用 Kruskal-Wallis 单因素方差分析(ANOVA)、Wilcoxon 检验、普氏分析、主坐标分析(PCoA)和 STAMP 分析等统计工具,分析不同灌溉方式土壤及再生水与土壤中 ARGs、MGEs 与微生物群落(MCs)之间的差异或相关性.采用变异分配分析(VPA)确定 HGT 和垂直基因转移(VGT)对 ARGs 的相对贡献.

按检出率大于等于 70%的标准筛选 ARGs、MGEs 和 MCs 数据,并基于它们之间强而显著的相关矩阵(Spearman 相关系数 $\rho>0.8$; $P<0.01$)进行网络分析.网络可视化是使用 Gephi(v0.9.2)实现的.所有统计分析均使用 R(v4.2.2) 和 Venn,ggplot2, pheatmap,gplots,permute,lattice 和 vegan 软件包进行.

2　结果与讨论

2.1　再生水-土壤灌溉系统抗生素耐药性特征概述

在再生水-土壤灌溉系统中,耐药组的丰度范围为 50.95~111.83×/Gb(图 1a).在本系统中,共鉴定出 29 种 ARG 类型,其中喹诺酮(6.11~16.39×/Gb)类、四环素(7.36~12.54×/Gb)类、夫西地酸(5.34~9.12×/Gb)类 ARGs 丰度最高,这 3 种 ARGs 的总和占到了耐药组总丰度的 33.33%~41.05%.在鉴定出 442 种 ARG 亚型中,*tufA*、*fusA*、*gyrB*、*rpoB* 和 *gyrA* 显示出较高的丰度,单一样品中的加和丰度为 20.70~29.28×/Gb.值得注意的是,在系统中检测到一些高风险的亚型,比如,*mcr* 系列、*tetX*、OXA 系列.以 *mcr-1* 为代表的

mcr 系列基因,能够通过质粒介导的 HGT 过程在菌株间传播,导致对粘菌素的耐药性[22];通常位于质粒上的 *blaOXA* 和 *blaVIM*,可导致细菌对碳青霉烯类抗生素的耐药性,该类抗生素被视为治疗肺炎克雷伯菌感染的最后手段[23].既往研究表明,这些高风险 ARGs 多见于人类和动物粪便样本[10,24],而在再生水及灌溉土壤中的检出,可能表明了这些 ARGs 的跨介质传播[25].

系统中不同介质之间的耐药组特征具有明显区别.其中,再生水中耐药组的丰度为 96.77~111.83×/Gb,远远高于土壤介质(50.95~68.62×/Gb)(方差分析,$P<0.05$).在类型水平上,再生水中检测到了全部 27 种 ARG 类型,丰度最高的前 5 类依次为喹诺酮类、四环素类、多药类、夫西地酸类和大环内酯类,这些抗生素在医疗和畜牧业中被广泛应用[26-27].相比之下,土壤中检出的 ARG 类型仅为 18~22 种,其中,未受灌溉的原始土壤中仅检测到 18 种 ARG 类型.土壤中优势 ARG 类型与再生水多有重合,仅大环内酯类 ARGs 丰度略低.在亚型水平上,再生水与土壤介质在检出的 ARG 亚型数量(方差分析,$P<0.01$)及其主要亚型构成上均表现出显著差异,PCoA 也进一步揭示了再生水和土壤之间耐药组构成的明显差异(图 1(b)),暗示了再生水灌溉可能是造成土壤耐药性的重要途径.

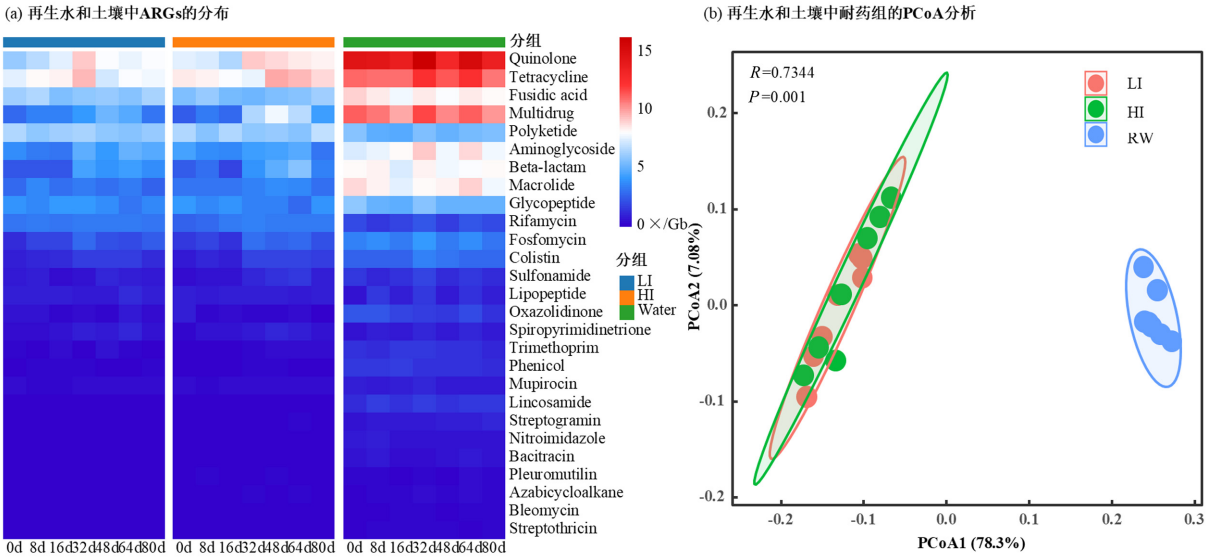


图 1 再生水-土壤灌溉系统中耐药组的特征

Fig.1 Characteristics of resistance groups in reclaimed water-soil irrigation system

2.2 灌溉水量差异对再生水灌溉土壤耐药组的影响

正如前文所说,再生水耐药组的丰度和多样性显著高于土壤耐药组,这意味着灌溉可能会导致再生水中的 ARGs 转移到土壤中.与未经灌溉的原始土壤相比,灌溉土壤中耐药组的总丰度增长了 4.04%~28.62%(图 2(a)).在类型水平上,粘菌素类 ARGs 的增幅最大,为 28.82%~151.01%,*β*-内酰胺、多药等类型 ARGs 的丰度也有较为明显的升高.同样地,灌溉土壤耐药组的多样性也有所升高(图 2(a)),在再生水灌溉后,链阳菌素、杆菌肽和林可酰胺 3 种类型的 ARGs 在土壤中被检出.显然,灌溉会引入新的 ARGs 进入土壤中并提高某些原有 ARGs 的丰度,但是,在持续灌溉过程中,土壤耐药组的丰度和多样性并不是随灌溉时间持续上升的(Spearman 相关性分析,$P>0.1$),而是呈现出整体上先上升后下降的波动变化过程,类似的情况在再生水受纳河流中也有发现[28].

出乎意料的是,灌溉水量的差异对土壤耐药组的影响与预估存在一定差异.具体而言,高灌溉量确实会进一步强化土壤耐药性水平,但两个实验组之间耐药组丰度和多样性并没有显著性差异(方差分析,$P>0.1$).具体来讲,在灌溉的前、中期,随灌溉时间的延长,实验组之间的差距增大,但到灌溉后期,耐药性水平降低,差异性减弱.土壤与再生水在微生物的绝对丰度方面通常有数量级的差距[29],土壤的基质效应和恢复能力导致的灌溉后期耐药性降低可能

是造成灌溉水量差异不产生显著影响的重要因素.针对土壤中能够稳定检出的ARG类型进行STAMP分析(图 2(b)),结果显示,HI 组中更多的类型丰度较高,但是相对于 LI 组并没有显著性区别.甚至,部分类型 ARGs 的丰度低于 LI 实验组,其中,夫西地酸类 ARGs 的丰度存在显著性差异(方差分析,P<0.1).

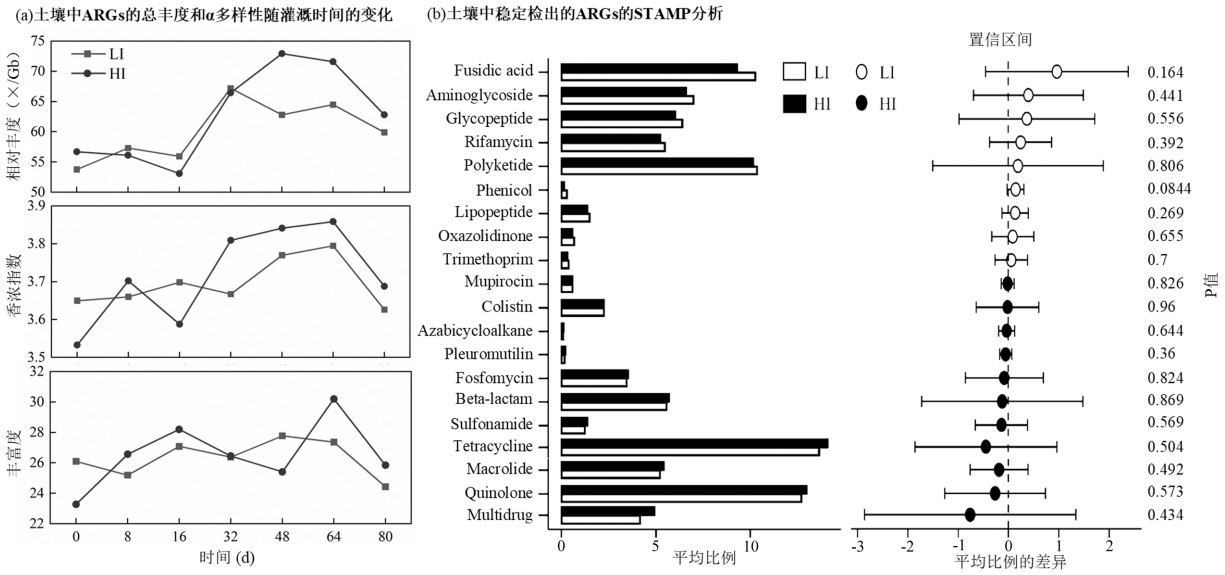


图 2　不同再生水灌溉量对土壤耐药组的影响

Fig.2　The effect of different amounts of reclaimed water irrigation on soil resistance groups

表 1　灌溉土壤中的 ARGs 与灌溉时间和总丰度的相关性统计

Table 1　Correlation statistics of ARGs in irrigated soil with irrigation time and total abundance

实验组	灌溉时间			总丰度		
	ARGs	P 值	ρ 值	ARGs	P 值	ρ 值
LI (P<0.1)	磷霉素类	0.066	0.750	β-内酰胺类	0.003	0.964
	螺嘧啶三酮类	0.066	0.750	粘菌素类	0.003	0.964
	莫匹罗星类	0.034	0.821	螺嘧啶三酮类	0.007	0.929
	链阳霉素类	0.044	−0.768	喹诺酮类	0.024	0.857
				氨基糖苷类	0.034	0.821
				磷霉素类	0.034	0.821
				多药类	0.088	0.714
HI (P<0.1)	甲氧苄啶类	0.024	0.857	β-内酰胺类	0.007	0.929
	粘菌素类	0.066	0.750	喹诺酮类	0.012	0.893
	磺胺类	0.066	0.750	螺嘧啶三酮类	0.012	0.893
	螺嘧啶三酮类	0.088	0.714	多药类	0.012	0.893
	多药类	0.088	0.714	粘菌素类	0.024	0.857
				磺胺类	0.024	0.857
				磷霉素类	0.034	0.821
				甲氧苄啶类	0.048	0.786
				链阳霉素类	0.049	0.757

在灌溉土壤中,在 STAMP 分析中认定为高灌溉量优势的 ARG 类型的丰度变化多与灌溉时间呈正相关关系,并且以 β-内酰胺类、多粘菌素类 ARGs 为代表的多个类型表现出显著性(表 1).它们多随耐药组整体共同变化,与总丰度呈现正相关关系(表 1).鉴于这些 ARGs 在再生水中的丰度普遍远高于土壤,灌溉成为推动其在土壤中丰度不断攀升的关键因素.相比之下,土壤中认定为低灌溉量优势的 ARG 类型多呈现出丰度随灌溉时间下降的趋势,且与耐药组整体丰度也多呈负相关.奇怪的是,尽管再生水中夫西地酸和糖肽类 ARGs 也显著高于土壤(Wilcoxon 检验,P<0.001),但此类 ARGs 在土壤中的定殖和传播受到了阻碍.这可能归因于再生水中此类 ARGs 的主要宿主难以适应土壤环境,或其在与土壤中功能相近微生物的竞争中处于弱势,无法大规模定殖[30].

2.3　再生水灌溉量增加会提升土壤抗生素耐药性风险

综合人类可及性、传播性、人类致病性和临床相关性识别 ARGs 的 RI[19],对灌溉土壤中耐药组的 TRI 进行了量化评估.在土壤耐药组中共识别出 38 个风险 ARGs(图 3(a)),单一样品中风险 ARGs 的数量为 12~24 个,占样品总 ARGs 数量的 12.63%~20.00%.在所有的风险 ARGs 中,多药类(13 个)、四环素类(9 个)和氨基糖苷类(5 个)ARGs 的数量最多.值得注意的是,有 7 个多药类风险 ARGs 达到了 Q1 水平,并且在土壤样本中稳定检出的同时展现出较高的丰度水平,需要引起足够的重视.

灌溉过程中土壤耐药组的 TRI 和风险 ARGs 数

量如图所示(图 3(b)),相较于原始土壤,受灌溉后土壤耐药组的 TRI 及检测到的风险 ARGs 数量均有提升.但具体来说,在灌溉过程中,低灌溉量实验组 TRI 整体上呈现无规律的波动变化,与灌溉时间的相关性极弱(Spearman 相关性检验, r=0.036,P=0.939).而高灌溉量实验组 TRI 的升高趋势更为明显(Spearman 相关性检验,r=0.464,P=0.294).但与耐药组丰度特征类似,灌溉量不同造成的差异主要体现在灌溉中期,整体来讲,两个实验组之间的差异性并不显著(方差分析,P>0.1).相对于 TRI,灌溉量差异对土壤耐药组风险 ARGs 数量的影响更为明显,两组之间存在显著差异性(方差分析,P<0.1),但在检出率上有较大差异的风险 ARGs 多为 Q2−Q4 水平,较低的 RI 值对 TRI 的影响不大.

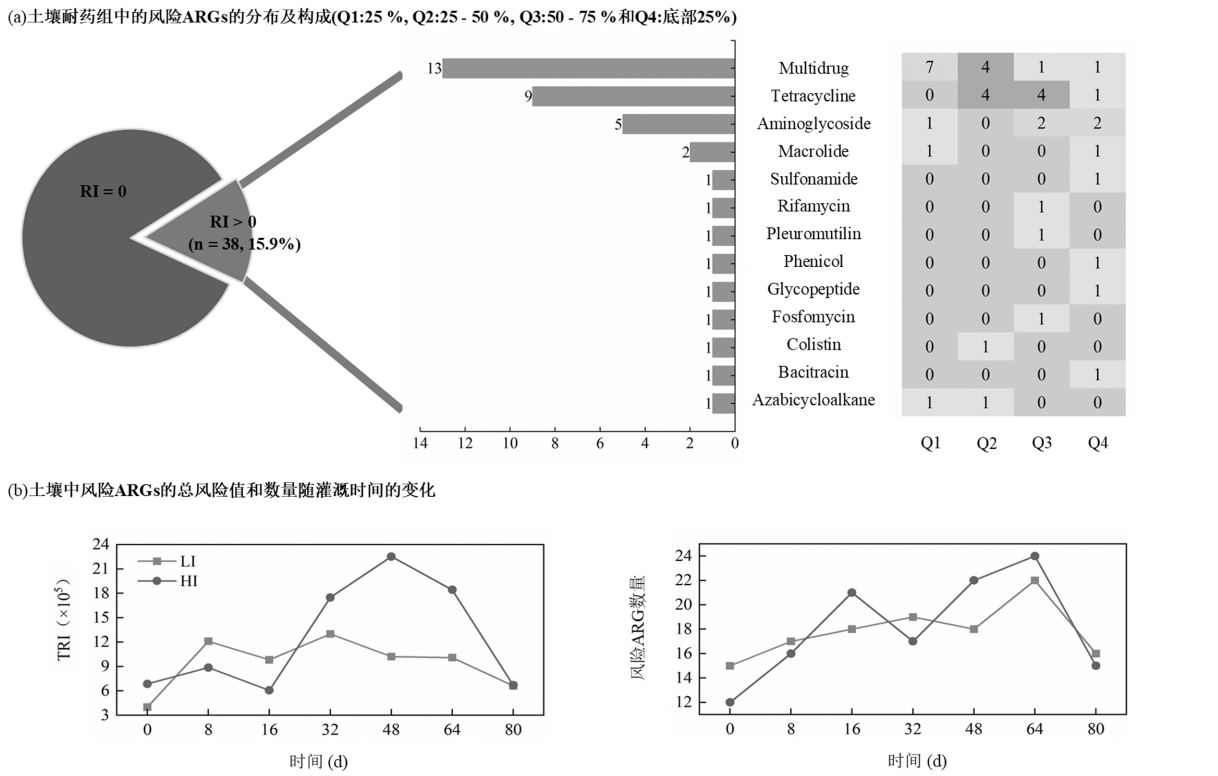


图 3 再生水灌溉土壤抗生素耐药性风险

Fig.3 Risk of antibiotic resistance in soil irrigated with reclaimed water

2.4 再生水灌溉对土壤耐药性的贡献分析

如上所述,再生水灌溉加剧了土壤中抗生素耐药性水平,但仅通过耐药组丰度和多样性的变化并不能判断再生水灌溉对土壤的污染机制,即再生水中 ARGs 的定殖起主要作用,亦或是灌溉所携带的营养物质、选择剂等成分促进了原始土壤中 ARGs 的传播.因此,采用基于机器学习的微生物源解析工具 FEAST 来量化再生水灌溉对土壤耐药组的贡献度(图 4).结果显示,再生水对灌溉土壤耐药组的贡献率为 6.59%~20.28%,再生水贡献率的变化类似于耐药组丰度和多样性,整体呈先升高后降低的变化过程,峰值出现在灌溉中期,这意味着再生水中 ARGs 的定殖可能是土壤耐药组丰度和多样性变化的主要原因.相比之下,高灌溉水量增大了再生水在灌溉土壤融合耐药组中的贡献度更高,但差别并不显著(方差分析,P>0.1).

尽管再生水对灌溉土壤中 ARGs 的贡献相当显著,但原始土壤仍被识别为灌溉土壤耐药组的主要源,其贡献率为 31.38%~75.47%,这主要得益于土壤的中 ARGs 绝对丰度上的优势.此外,原始土壤的微生物群落高凝聚力和非生物过滤作用可能抑制再生水的微生物的定殖,进一步确保原始土壤特征占据主导地位[29,31-32].需要注意的是,两个实验组中,原始土壤的贡献率变化趋势一致,且在灌溉的前、中期,贡献率数值也处于同一水平,但在灌溉后期,HI 组的数值明显低于 LI 组,即使在 80d 样本中有所恢复,但组间差异仍十分明显.这部分差异并未主要被分配

到再生水贡献中,而是被划定为未知源.在尽量保证不受外源影响的实验室条件中,未知源通常可以被解释为一些内在的反应,如原始土壤中本土细菌的影响以及再生水与原始土壤之间的相互作用[32].更高的再生水灌溉量可能改变了 ARG 宿主在群落中的作用或地位,导致源特征的消散.

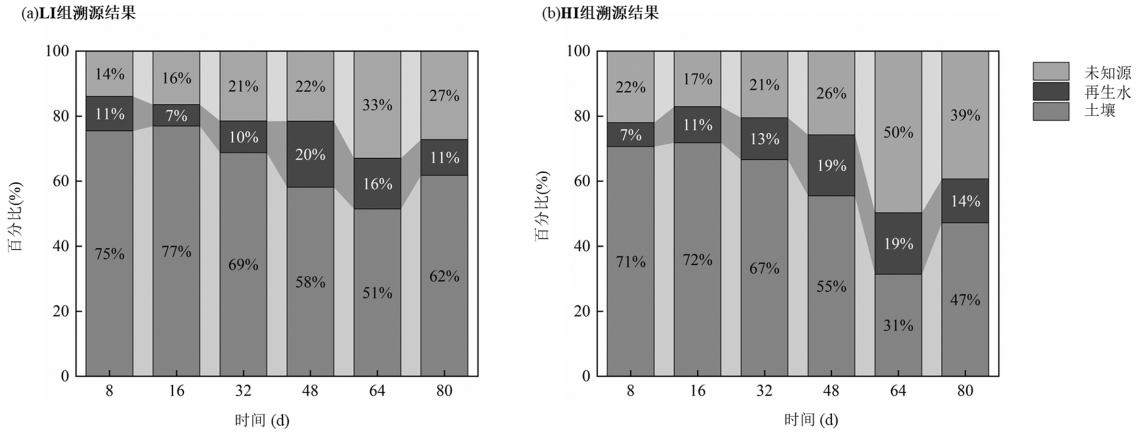


图 4　再生水灌溉对土壤耐药组的贡献度

Fig.4　Contribution of reclaimed water irrigation to soil resistance group

2.5　再生水灌溉量差异改变了土壤耐药组的传播机制

本研究在灌溉土壤中鉴定出 49 个细菌门和 6 个古细菌门,优势门为变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、酸杆菌门(Acidobacteria)和硝化螺旋菌门(Nitrospirae).在低等级水平上共鉴定出 1476 个属水平分类群和 4941 个种水平分类群,丰度最高的分类群主要属于变形菌门和放线菌门.土壤中变形菌门、硝化螺旋菌门、拟杆菌门(Bacteroidetes)和芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)等微生物门的丰度随再生水灌溉而升高.值得注意的是,再生水中变形菌门的平均丰度仅为 37.74%,这意味着可能再生水中变形菌门的定殖对灌溉土壤变形菌门的优势性的贡献很小,亦或是对土壤中的变形菌门进行了替代.先前的研究表明,随宿主繁殖、死亡而进行的 VGT 过程通常主导环境中 ARGs 的概况[33].本研究中,普氏分析结果表明,两个实验组中土壤微生物组和耐药组之间均具有显著相关性(LI:M^2=0.01,P<0.05;HI: M^2=0.02, P<0.1).而网络分析结果显示(图 5(a、b)),LI 中识别到 1411 组分类群和 ARGs 的显著相关关系,占整个网络边数量的 91.09%.而 HI 中也有 1261 组显著相关的边,占比为 83.02%.这样的结果表明,宿主微生物的组成特征是影响再生水灌溉土壤耐药组变化的重要因素,这在 LI 实验组中尤为明显.

MGEs 可以促进 ARGs 跨分类群水平转移,在 ARGs 传播中发挥着关键作用[34].本研究在灌溉土壤中鉴定出 55 种 MGEs,包括 25 种转座酶、5 种质粒、22 种插入序列和 3 种整合子.灌溉土壤中 MGEs 的丰度和多样性高于原始土壤,意味着再生水灌溉可能提高了土壤中 ARGs 的传播性.LI 和 HI 实验组的 ARG 传播网络中分别鉴定出 18 个和 19 个 MGE 类节点(图 5(a、b)),数量接近,但 ARG-MGE 类边的数量分别为 48 条和 80 条,这意味着更高的再生水灌溉量会进一步提高土壤中 ARGs 的传播,增加了其多重耐药风险.而 HI 组中 ARGs 共现的概率是 LI 组的两倍,这进一步印证了上述观点.网络分析还揭示了整合子 *intI1* 可能参与了多个 ARGs 的 HGT. *intI1* 是一种潜在的人类活动标志物,其广泛检测反映了人类活动的影响[35].先前的研究亦发现,与非灌溉土壤相比,灌溉土壤中 *intl1* 介导的 ARGs 传播性更强[36].

使用 VPA 定量解析灌溉土壤耐药组的传播机制(图 5(c、d)),结果表明,VGT 是土壤 ARGs 传播的主要机制,分别解释了 LI 和 HI 实验组中耐药组变化的 66.8%和 57.6%.而 HGT 过程的贡献分别为 31.2%和 39.2%,进一步证明了高灌溉量对 HGT 的促进作用.对此现象,可从两方面进行阐释:一是再生水中 MGEs 的丰度高,再生水灌溉提高了土壤中 MGEs 的丰度和多样性;二是再生水中高营养成分为 HGT 过

程提供了必要的养分,促进了 HGT 过程的发生[37].另外,HI 组中残差值也更高,这可能也与 HGT 过程有关.HGT 使更多的微生物获得了耐药性,这强化了它们的生态竞争力,可能更大程度的改变了微生物之前的相互作用关系[38],这也是 HI 组中耐药组源特征弱化的重要原因.

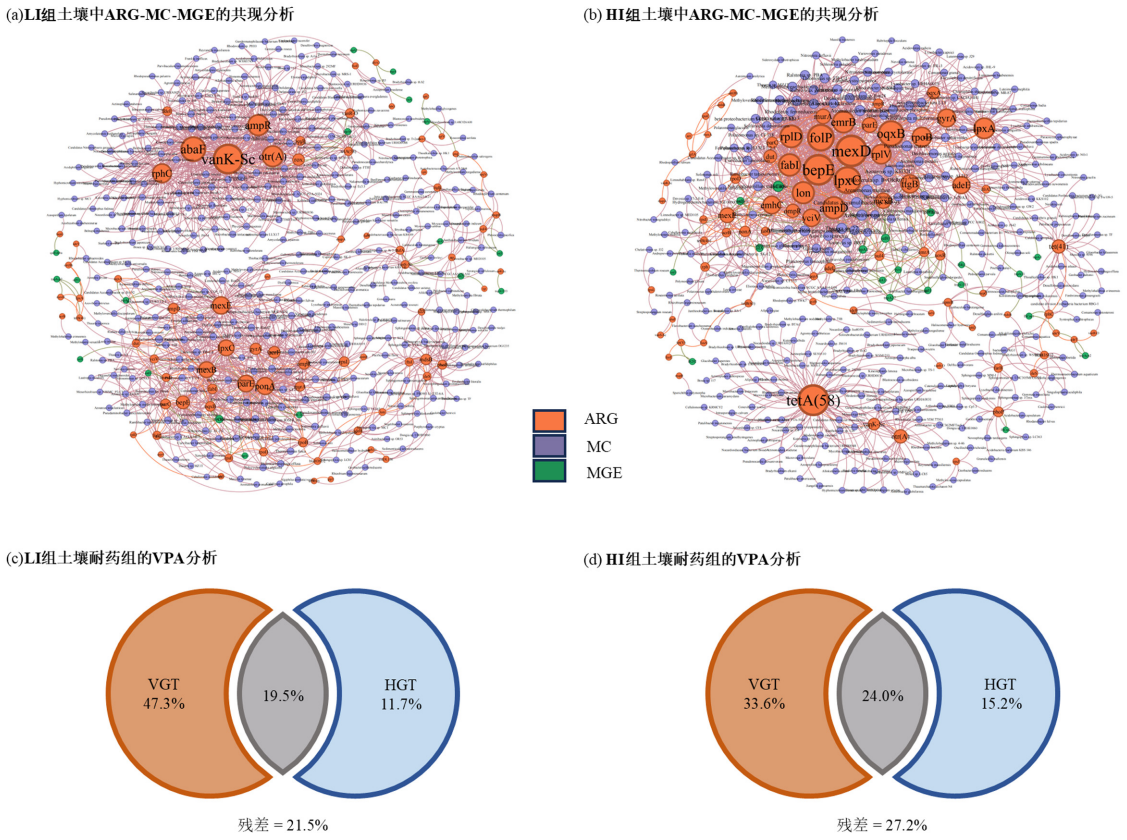


图 5 土壤耐药组的传播

Fig.5 The transmission of soil resistance groups

3 结语

本研究通过构建对照实验,探究了灌溉水量差异对抗生素耐药性传播的影响.结果表明,再生水会导致土壤中 ARGs 丰度增长了 4.04%~28.62%,而且灌溉量越大耐药性水平越高.但受土壤基质效应和恢复能力影响,在整个灌溉过程中,灌溉量差异对再生水灌溉土壤耐药性水平的影响并不显著.LI 组和 HI 组的网络分析结果中 ARG-MGE 类边的数量分别为 48 条和 80 条,表明高灌溉量提高了灌溉土壤 ARGs 的水平传播潜力,导致土壤 ARGs 源特征弱化.未来可以在场地尺度进行长周期灌溉实验,进一步揭示灌溉参数差异造成的影响,以在保证农业需求的基础上选择合理的灌溉参数.

参考文献:

[1] Wang F, Qiao M, Lv Z, et al. Impact of reclaimed water irrigation on antibiotic resistance in public parks, Beijing, China [J]. Environmental Pollution, 2014,184:247-253.

[2] Kumar K, Gupta S C, Baidoo S K, et al. Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure [J]. Journal of Environmental Quality, 2005,34(6):2082-2085.

[3] Martinez J L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants [J]. Environmental Pollution, 2009,157(11):2893-2902.

[4] Bengtsson-Palme J, Kristiansson E, Larsson D G J. Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2018,42(1):68.

[5] Mckenna M. Antibiotic resistance: The last resort [J]. Nature, 2013,499(7459):394-396.

[6] Guo X, Yan Z, Zhang Y, et al. Behavior of antibiotic resistance genes under extremely high-level antibiotic selection pressures in pharmaceutical wastewater treatment plants [J]. Science of The Total Environment, 2018,612:119-128.

[7] Yi L, Jiao W, Chen X, et al. An overview of reclaimed water reuse in China [J]. Journal of Environmental Sciences, 2011,23(10):1585-1593.

[8] Thebo A L, Drechsel P, Lambin E F, et al. A global, spatially-explicit assessment of irrigated croplands influenced by urban wastewater flows [J]. Environmental Research Letters, 2017,12(7):074008.

[9] Chen J, Liu C, Teng Y, et al. The combined effect of an integrated reclaimed water system on the reduction of antibiotic resistome [J]. Science of The Total Environment, 2022,838.

[10] Liu C, Shan X, Song L, et al. Metagenomics-assembled analysis revealed the characteristics of antibiotic resistome and community coalescence in the soils irrigated with different irrigation materials [J]. Science of The Total Environment, 2024,907.

[11] Zhang G J, Guan Y T, Zhao R X, et al. Metagenomic and network analyses decipher profiles and co-occurrence patterns of antibiotic resistome and bacterial taxa in the reclaimed wastewater distribution system [J]. Journal of Hazardous Materials, 2020,400.

[12] Chen C, Li J, Chen P, et al. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistances in soils from wastewater irrigation areas in Beijing and Tianjin, China [J]. Environmental Pollution, 2014,193:94-101.

[13] 王月婷.黑果腺肋花楸各生长发育时期需水规律与最佳灌溉制度研究 [D]. 银川:宁夏大学, 2022.
Study on the law of water requirement and the optimal irrigation system of aronia melanpcarpa(Michx.) Elliott at different growth and development stages [D]. Yinchuan: Ningxia University, 2022.

[14] Wang C, Wu R, Guo J, et al. Effects of Cr(VI)-reducing bacteria on the behaviour of Cr(VI) adsorption by goethite and haematite: Speciation and distribution [J]. Journal of Soils and Sediments, 2020, 20(10):3733-3741.

[15] Li Y, Xu Z, Han W, et al. HMD-ARG: hierarchical multi-task deep learning for annotating antibiotic resistance genes [J]. Microbiome, 2021,9(1).

[16] Pärnänen K M M, Narciso-Da-Rocha C, Kneis D, et al. Antibiotic resistance in European wastewater treatment plants mirrors the pattern of clinical antibiotic resistance prevalence [J]. Science Advances, 2019,5(3):eaau9124.

[17] Menzel P, Ng K L, Krogh A. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju [J]. Nature Communications, 2016,7.

[18] Xiong W, Wang Y, Sun Y, et al. Antibiotic-mediated changes in the fecal microbiome of broiler chickens define the incidence of antibiotic resistance genes [J]. Microbiome, 2018,6(1):34.

[19] Zhang Z, Zhang Q, Wang T, et al. Assessment of global health risk of antibiotic resistance genes [J]. Nature Communications, 2022,13(1): 1553.

[20] Shenhav L, Thompson M, Joseph T A, et al. FEAST: fast expectation-maximization for microbial source tracking [J]. Nature Methods, 2019,16(7):627-632.

[21] Baral D, Dvorak B I, Admiraal D, et al. Tracking the sources of antibiotic resistance genes in an urban stream during wet weather using Shotgun Metagenomic Analyses [J]. Environmental Science & Technology, 2018,52(16):9033-9044.

[22] Liu Y B, Wang Y P, Walsh T R P, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study [J]. The Lancet infectious diseases, 2016,16(2):161-168.

[23] Sahoo S, Routray S P, Mohanty J N, et al. Genomic characterization and distribution of XDR Klebsiella pneumoniae ST15carrying blaOXA-181 on ColKP3plasmid from an ICH patient in eastern India: A global comparative analysis [J]. Gene Reports, 2024,13(1):70.

[24] Pal C, Bengtsson-Palme J, Kristiansson E, et al. The structure and diversity of human, animal and environmental resistomes [J]. Microbiome, 2016,4(1):54.

[25] Gouliouris T, Raven K E, Moradigaravand D, et al. Detection of vancomycin-resistant Enterococcus faecium hospital-adapted lineages in municipal wastewater treatment plants indicates widespread distribution and release into the environment [J]. Genome research, 2019,29(4):626-634.

[26] Brdová D, Ruml T, Viktorová J. Mechanism of staphylococcal resistance to clinically relevant antibiotics [J]. Drug Resistance Updates, 2024,77.

[27] Samanta I, Bandyopadhyay S. Chapter 16-Staphylococcus [M]// Samanta I, Bandyopadhyay S. Antimicrobial resistance in agriculture, Academic Press, 2020:195-215.

[28] Liu C, Shan X, Zhang Y, et al. Microcosm experiments revealed resistome coalescence of sewage treatment plant effluents in river environment [J]. Environmental Pollution, 2023,338.

[29] Mola M, Kougias P G, Statiris E, et al. Short-term effect of reclaimed water irrigation on soil health, plant growth and the composition of soil microbial communities [J]. Science of The Total Environment, 2024,949.

[30] Xiao D, Chen M, He X, et al. Soil nutrients and vegetation along a karst slope gradient affect arbuscular mycorrhizal fungi colonization of roots rather than bulk soil AMF diversity [J]. Plant and Soil, 2023,489(1/2):139-154.

[31] Macarthur R. Species packing and competitive equilibrium for many species [J]. Theoretical Population Biology, 1970,1(1):1-11.

[32] Ma D, Chen H, Feng Q, et al. Dissemination of antibiotic resistance genes through fecal sewage treatment facilities to the ecosystem in rural area [J]. Journal of Environmental Management, 2023,333.

[33] Zhao R, Yu K, Zhang J, et al. Deciphering the mobility and bacterial hosts of antibiotic resistance genes under antibiotic selection pressure by metagenomic assembly and binning approaches [J]. Water Research, 2020,186.

[34] Halling-Sørensen B, Nors Nielsen S, Lanzky P F, et al. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review [J]. Chemosphere, 1998,36(2):357-393.

[35] Zhang K, Xin R, Zhao Z, et al. Mobile genetic elements are the major driver of high antibiotic resistance genes abundance in the upper reaches of Huaihe river basin [J]. Journal of Hazardous Materials, 2020,401.

[36] Seyoum M M, Obayomi O, Bernstein N, et al. Occurrence and distribution of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes in different soil types irrigated with treated wastewater [J]. Science of The Total Environment, 2021,782:146835.

[37] Wang D, Shang J, Lin H, et al. Identifying ARG-carrying bacteriophages in a lake replenished by reclaimed water using deep learning techniques [J]. Water Research, 2024,248:120859.

[38] Wang S, Li W, Xi B, et al. Mechanisms and influencing factors of horizontal gene transfer in composting system: A review [J]. Science of The Total Environment, 2024,955:177017.

作者简介：张芷柔(1999-),女,河北省沧州市人,北京师范大学硕士研究生,主要从事水土污染过程模拟与控制方面研究.发表论文 2 篇. zhangzhirou3@163.com.